

骨芽細胞における FGF シグナルと NF- κ B シグナル の相互作用に関わるPP2A 調節サブユニットについて の研究

鈴木, あずさ

<https://doi.org/10.15017/4060088>

出版情報 : Kyushu University, 2019, 博士 (歯学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

骨芽細胞における FGF シグナルと NF- κ B シグナルの
相互作用に関わる PP2A 調節サブユニットについての研究

2020 年 3 月

九州大学大学院歯学府 歯学専攻 口腔顎顔面外科学分野

鈴木 あずさ

九州大学大学院歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野

指導教官 森 悦秀 教授

対 象 論 文

本論文の一部は下記の論文に掲載されたものである。

Regulation of NF- κ B signalling through the PR55 β -RelA interaction in osteoblasts

Azusa Suzuki, Goro Sugiyama*, Yukiko Ohyama, Wataru Kumamaru, Tomohiro Yamada and
Yoshihide Mori

International Journal of In Vivo Research, 2019, accepted

略語一覧

α -MEM : Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification (イーグル最小必須培地 α 改変型)

ALP : alkaline phosphatase (アルカリホスファターゼ)

BMP2 : bone morphogenetic protein 2 (骨形成タンパク質 2)

CBB : coomassie brilliant blue (クマシーブリリアントブルー)

cDNA : complementary deoxyribonucleic acid (相補的デオキシリボ核酸)

E1 : MC3T3E-1 (マウス骨芽細胞様細胞)

ERK : Extracellular Signal-regulated Kinasa (細胞外シグナル調節キナーゼ)

FBS : fetal bovine serum (ウシ胎仔血清)

FGF : fibroblast growth factor (線維芽細胞増殖因子)

FGFR : fibroblast growth factor receptor (線維芽細胞増殖因子受容体)

GST : glutathione S-transferase (グルタチオン S-トランスフェラーゼ)

mRNA : messenger ribonucleic acid (メッセンジャーリボ核酸)

NF- κ B : nuclear factor kappa-chain-enhancer of activated B cells (核内因子カッパー B)

PBS : phosphate-buffered saline (リン酸緩衝食塩水)

PCR : polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)

pERK : phospho extracellular Signal-regulated Kinasa (リン酸化細胞外シグナル調節キナーゼ)

PP2A : protein phosphatase 2A (タンパク質脱リン酸化酵素 2A)

PR55 β : protein phosphatase 2A regulatory subunit 55 beta (タンパク質脱リン酸化酵素 2A
調節サブユニット 55 β)

RHD : Rel homology domain (Rel ホモロジードメイン)

RNA : ribonucleic acid (リボ核酸)

SDS : sodium dodecyl sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム)

Ser536 : Serin 536 (アミノ酸 536 番目セリン)

siRNA : small interfering RNA (低分子干渉性リボ核酸)

TA2 : transactivation 2 (トランスアクチベーション 2)

TBST : Tris-buffer saline Tween-20 (Tween-20 含有トリス緩衝液)

TNF- α : tumor necrosis factor alpha (腫瘍壊死因子 α)

WB : western blotting (ウエスタンブロット)

目次

| | |
|-------|----|
| 要旨 | 1 |
| 緒言 | 3 |
| 材料と方法 | 6 |
| 結果 | 14 |
| 考察 | 25 |
| 謝辞 | 31 |
| 参考文献 | 32 |

要 旨

骨芽細胞で活性化される線維芽細胞増殖因子 (FGF) シグナルは、細胞増殖を促進させながら骨形成に関わる極めて重要なシグナル伝達経路である。一方で、細胞分化に対する FGF の影響については確立した見解がなく、不明な点が多い。また、FGF シグナルは様々なタンパク質キナーゼにより活性化されるが、これに対してタンパク質ホスファターゼによる制御機構も存在する。このうち、タンパク質脱リン酸化酵素 2A (PP2A) は FGF シグナルとの関連性が示唆される主要なホスファターゼの一つであり、骨芽細胞においても重要な役割を担うと考えられる。PP2A は足場サブユニット、触媒サブユニットの他に、基質特異性や細胞局在、酵素活性の機能を規定する調節サブユニットが存在する。圧倒的多数のキナーゼに対応するためには、この調節サブユニットの役割が重要となる。しかしながら、骨芽細胞における FGF シグナルの活性化と関連する調節サブユニットについては明らかになっていない。そこで、本研究ではマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 (E1) 細胞において FGF シグナルが E1 細胞の分化に対する影響を検討し、主要な FGF である FGF2 刺激で活性化した FGF シグナルにおける PP2A 調節サブユニットの発現様式について検討を行った。まず FGF2 (6.2 ng/mL~100 ng/mL) および骨形成タンパク質 2 (100 ng/mL) で刺激を行ったところ、アルカリホスファターゼ活性測定において FGF2 は高濃度の刺激では酵素活性を抑制した。しかし低濃度の FGF2 刺激では逆に酵素活性を促進した。FGF2 刺激での細胞数の増加は低濃度と高濃度刺激で差はなかった。一方で、細胞形態は低濃度 FGF2 刺激により策状の変化が認められた。次に、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法では、*Ppp2r2b* 遺伝子の発現量が増加した。また、ウェスタンブロット法による解析においても翻訳産物であるタンパク質脱リン酸化酵素 2A 調節

サブユニット 55 β (PR55 β) の発現量が増加したことを確認した。E1 細胞に低分子干渉性リボ核酸を遺伝子導入し骨芽細胞分化に対する影響を検討したが、有意な差は認められなかった。

骨芽細胞における FGF シグナルは細胞増殖や分化に対する影響だけでなく、炎症反応時にも治癒促進作用として機能する。FGF シグナルと主要な炎症性シグナルである核内因子カッパー B (NF- κ B) シグナルの関連性が示唆されるものの、その作用機序は不明な点が多い。そこで、PR55 β を介した FGF シグナルと NF- κ B シグナルの関連性について検討した。NF- κ B サブファミリーの RelA/p65 は 腫瘍壊死因子 α (TNF- α) 刺激によってリン酸化されるが、FGF2 刺激によってその効果が減弱した。また *siPpp2r2b* 遺伝子導入も同時に行うと、その減弱作用が解除された。さらに RelA の細胞内局在を検討した場合も、FGF2 刺激により TNF- α 誘導性の RelA の核内移行が阻害され、*siPpp2r2b* 遺伝子導入がこれを解除した。NF- κ B 転写活性測定においても FGF2 刺激は転写活性を抑制し、*siPpp2r2b* 遺伝子導入によりこの効果は減弱された。RelA と PR55 β の相互作用では、免疫沈降実験において RelA と PR55 β の結合が認められ、さらにリコンビナントタンパク質を用いた結合実験からトランスアクチベーション 2 ドメインを介した直接的な結合が明らかになった。

以上のことにより、骨芽細胞において FGF2 誘導性の FGF シグナルの活性化により発現量が増加した PR55 β は、NF- κ B の RelA サブファミリーと相互作用することで NF- κ B シグナルを負に制御する介在分子である可能性が示唆された。本研究により、PR55 β が FGF シグナルと NF- κ B シグナルを結ぶ機能調節分子としての役割を担うことが考えられた。

緒 言

破骨細胞による骨吸収に対して、ビスホスホネート製剤や抗 RANKL 抗体製剤による骨吸収阻害薬が開発され、骨粗しょう症や悪性腫瘍の骨転移などの骨疾患に対して、第一選択薬として広く普及している。一方で、治療効果に抵抗性が認められる症例や薬剤関連顎骨壊死が出現する可能性などから、新たな作用機序をもつ治療薬の開発が望まれている。近年、骨芽細胞を標的にした骨粗しょう症治療薬が開発されてきており、既存の治療薬とは異なる作用機序を持つ薬剤として注目されている (1)。骨芽細胞の分化や増殖は、多くのサイトカインによる調節をうけており、骨代謝における重要な役割を担う。中でも、線維芽細胞増殖因子 (FGF) は細胞増殖や発生、創傷治癒などに重要なサイトカインであり、FGF シグナルの活性化は骨芽細胞の増殖を促進させる (2)。FGF ファミリーは 23 のメンバーからなり、標準的な FGF (1~10, 16~18, 20, 22)、ホルモン様 FGF (15/19, 21, 23)、および細胞内 FGF (11~14) の 3 つの異なるサブファミリーに分けることができる (3)。これらの FGF は、それぞれ異なる 4 つの線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) の細胞外ドメインに結合し、細胞内ドメインのチロシン残基がリン酸化されることで受容体を活性化させる。活性化された FGFR は様々なシグナル介在分子のリン酸化を介して、分裂促進因子活性化キナーゼ、ホスホイノシチド 3-キナーゼ /AKT、およびホスホリパーゼ C- γ /プロテインキナーゼ C 経路といった主要な下流のシグナル伝達経路の活性化をもたらす (4)。とりわけ FGF2 は全身のほとんどの臓器に存在しており、生体内に必要な主要な増殖因子とされる。FGFR は骨芽細胞の膜表面にも発現しており、主に FGFR1 を介した FGF2 の作用が報告されている (5)。しかしながら、骨芽細胞の増殖に対す

る作用は多く見受けられるものの、FGF2 が骨芽細胞分化に及ぼす影響については不明な点が多い。

FGF シグナルは複数のキナーゼによる介在分子のリン酸化により活性化されていく。その一方で、ホスファターゼによる脱リン酸化制御も受けている。このキナーゼとホスファターゼによるリン酸化制御機構により、FGF シグナルの活性化は細胞内で厳密に調節されている。生体内に圧倒的多数のセリン・スレオニンキナーゼが存在するのに対して、ヒトゲノムに存在するセリン・スレオニンホスファターゼは僅か 45 種類程度しか存在しない。そのうち、タンパク質脱リン酸化酵素 2A (PP2A) は主要なタンパク質ホスファターゼの一つであり、生体内のあらゆる組織でユビキタスに発現するセリン・スレオニンホスファターゼである。骨芽細胞においてもその発現が認められており、FGF シグナルの制御分子としての関連性も示唆されている (6)。PP2A は細胞内では主に二量体もしくは三量体として存在する (7)。足場サブユニットと触媒活性の中心を担う触媒サブユニットによって構成される二量体に加えて、基質特異性や細胞内局在、酵素活性の強度などの機能を調節する役割を担う、様々な調節サブユニット (B サブユニット) が存在する。B サブユニットは大きく四つのクラス (PR/B, PR/B', PR/B'', PR/B''') に分類され、それぞれのサブクラスに対して複数のアイソフォームが見出されている (8)。迅速かつ正確に細胞内のシグナル伝達を作用させるためには、適切にホスファターゼを機能させるための B サブユニットの役割が極めて重要である。

FGF シグナルには創傷治癒促進作用もあり、炎症による骨吸収に対しても周囲の骨芽細胞にはたらきかけ、骨新生を誘導する (9)。臨床的にも、この作用機序は歯周炎により喪失した歯槽骨の再

生に寄与する製剤として応用されている。核内因子カッパー B (NF- κ B) は主要な炎症性シグナルであり、細菌感染や外傷に起因する骨組織の炎症に反応して活性化する。NF- κ B は classI と classII ファミリーに大別され、classI は転写抑制作用に關与するアンキリンリピート配列を有し、RelA/p65 を含む classII は C 末端側に転写活性ドメインを有する (10)。この両者からなる複合体は、腫瘍壊死因子 α (TNF- α) などの炎症性サイトカインによって活性化される。複合体を形成している I κ B タンパク質の脱リン酸化により、NF- κ B は核内へと移行し、転写活性が可能になる。RelA も複数のキナーゼによりリン酸化修飾をうけており、NF- κ B シグナルの活性化に寄与する。一方、PP2A の阻害剤により活性化されることから、PP2A の脱リン酸化への關与が示唆されているが、その機序はいまだ不明である。FGF シグナルと NF- κ B シグナルの關連性も報告されており、これらのシグナルは相互に影響を及ぼしながら作用する (11)。しかしながら、FGF シグナルの活性化により NF- κ B シグナルが抑制される分子作用メカニズムについてはいまだ不明な点が多い。

本研究では、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 (E1) 細胞を用いて、FGF2 により活性化された FGF シグナルが骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討した。またその作用機序として PP2A を介した脱リン酸化制御機構を考え、FGF2 誘導性の FGF シグナルの活性化によって、PP2A の B サブユニットの発現様式について検討した。さらに、NF- κ B シグナルとの關連性に着目し、PP2A の B サブユニットを介した NF- κ B シグナルの脱リン酸化制御機構の存在を検討した。本研究により、FGF シグナルが PP2A の B サブユニットを介して NF- κ B シグナルの脱リン酸化制御を可能にしている作用機序の一端を解明することができた。

材料と方法

1. 抗体と試薬

抗リン酸化細胞外シグナル調節キナーゼ (pERK) 1/2 抗体、抗細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) 1/2 抗体、抗リン酸化 RelA 抗体、抗 RelA 抗体、抗グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, MA) より購入した。抗タンパク質脱リン酸化酵素 2A 調節サブユニット 5 β (PR55 β) 抗体は Abcam (Cambridge, UK) より購入した。抗 β -actin 抗体は Sigma Aldrich (St Louis, MO) より購入した。FGF2 は R&D Systems (Minneapolis, MN) より購入した。TNF- α は (Rocky Hill, NJ) より購入した。PD161570 は Tocris Bioscience (Boston, MA) より購入した。骨形成タンパク質 2 (BMP2) は R&D Systems (Minneapolis, MN) より購入した。

2. 細胞培養

E1 細胞は理研細胞バンクより購入したものを使用した。培地は、ダッベルコ変法イーグル培地 (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) に L (+)-アスコルビン酸 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) 100 μ g/mL、ペニシリン G カリウム (Meiji Seika Pharma, Tokyo, Japan) 100 U/mL、ストレプトマイシン (Meiji Seika Pharma) 100 μ g/mL を添加して用い、終濃度が 10% となるようにウシ胎仔血清 (FBS) を加えた。37°C、湿度 100%、5% 二酸化炭素気相下で培養した。

細胞株の継代は、リン酸緩衝食塩水 (PBS) と 0.05% Trypsin/エチレンジアミン四酢酸 (Gibco)

を用いて行った。E1 細胞は、必要に応じて *Ppp2r2b* 遺伝子特異的な低分子干渉性リボ核酸 (siRNA) もしくはスクランブル塩基配列を用いたコントロール siRNA を遺伝子導入した。siRNA の遺伝子導入には Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Thermo Fisher Scientific) を使用した。用いた siRNA の塩基配列を以下に記す。

siCont. : 5'-AAUUCUCCGAACGUGUCACGU-3'

si*Ppp2r2b* : 5'-ACUUUCCACAGCUUCACAGUU-3'

3. アルカリホスファターゼ (ALP) 活性測定

予備実験として E1 細胞を 10% FBS で培養した後、セミコンフルエントの状態、FGF2 (6.2 ng/mL~100 ng/mL) 存在下または非存在下に、イーグル最小必須培地 α 改変型 (α -MEM, gibco) に Ascorbic acid (50 μ g/mL)、 β グリセロリン酸 (10 mM) を添加した分化誘導培地へ交換した。5 日間培養後、Tween-20 含有トリス緩衝液 (TBST) で洗浄しアセトン-エタノールで固定、再度 PBS で洗浄後、P-ニトロフェニルリン酸 (100 μ L) を基質として、ALP の酵素活性を吸光度 450 nm で iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いて測定した。同様の条件下で E1 細胞に対して BMP2 (100 ng/mL) 存在下に FGF2 (6.2 ng/mL~100 ng/mL) を添加し、ALP 活性を測定した。

4. 細胞数測定

同様の条件下で E1 細胞に FGF2 (1.5~100ng/mL) を添加した α -MEM にて 5 日間刺激した後、細胞を培養ディッシュから回収しエッペンドルフチューブに入れ混和した。この細胞懸濁液 100 μ L を血球計算盤で測定した。

5. 細胞免疫染色法

FGF2 刺激による細胞形態観測には間接蛍光抗体法を用いた。イメージングチャンバー 4 穴に FGF2 を 100 ng/mL 及び 1.5 ng/mL で調整した α -MEM にて刺激した E1 細胞の培養液をそれぞれ 24 時間培養した。また、細胞内局在の観察は TNF- α 、TNF- α /FGF2 及び TNF- α /FGF2/siPpp2r2b で刺激した E1 細胞をそれぞれ 24 時間培養して行った。PBS で洗浄し、10% formalin 下に室温で 10 分間固定した。PBS で 3 回洗浄し、Phalloidin 3.5 mL/PBS 500 μ L を遮光下で 37°C、30 分間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、退色防止剤入り 4',6-diamidino-2-phenylindole 封入剤 (Thermo Fisher Scientific) を用いて封入した。蛍光観察には蛍光顕微鏡 (BZ-9000, KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて撮影した。

6. Total RNA 抽出方法

前述の培地下で培養された E1 細胞は、PBS で十分に洗浄後に回収した。回収した培養細胞に TRIzol (Thermo Fisher Scientific) 1 mL を加え、超音波破碎により溶解し、室温で 10 分間放置

した。その後、クロロホルム (Wako Pure Chemical Industries) 200 μ L を加えて 3 分間攪拌し、室温で 3 分間放置後 4°C、14,500 rpm で 10 分間遠心分離した。リボ核酸 (RNA) を含む水層を約 300 μ L 採取して新たなチューブに移し、これにイソプロピルアルコール (Wako Pure Chemical Industries) 150 μ L を加えて混合し、室温で 10 分間放置した。その後、4°C、14,500 rpm で 30 分間遠心分離し、RNA を沈殿させた。上清を除去後、70% エタノール (Wako Pure Chemical Industries) 1 mL を加えて沈殿物を洗浄し、振盪攪拌した。混合後、4°C、14,500 rpm で 10 分間遠心分離し、沈殿物を室温で乾燥させ、RNase-Free H₂O 20 μ L に溶解した。その後、65°C 10 分間保温し、攪拌後氷冷した。RNase Inhibitor (Promega, Madison, WI) を 1 μ L を加え、分光光度計 (Ultrospec 3300 pro, GE Healthcare/Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) を用いて全 RNA の濃度を測定した。回収した約 3 μ g の全 RNA を鋳型として、40 U/ μ L の Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega) を 0.5 μ L、0.5 μ g/ μ L の逆転写プライマー pd (T)₁₂₋₁₈ を 1 μ L、250 mM トリス塩酸塩 (pH 8.3)、375 mM KCl および 15 mM MgCl₂ を含む 5×反応緩衝液を 4 μ L、100 mM dithiothreitol を 2 μ L、200 U/ μ L の SUSPERSCRIPT™II RNase H-Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を 0.5 μ L 加えて合計 20 μ L とし、42°C で 1 時間インキュベートした。その後、95°C で 5 分間加温して酵素を失活させ、直ちに氷冷して相補的デオキシリボ核酸 (cDNA) を合成した。これを RNase-Free H₂O で 10 倍に希釈し、メッセンジャーリボ核酸 (mRNA) の解析に用いた。

7. リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法による mRNA 発現量の解析

定量的リアルタイム PCR 法は、Light Cycler FastStart DNA Master SYBER Green 1 kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いた。反応条件は、熱変性を 95°C で 1 サイクル 10 分間行い、2 サイクル以降 10 秒間行った。アニーリング/伸長反応は 60°C で 10 秒間、72°C で 10 秒間とし、すべて 46 サイクルの増幅を行った。リアルタイム PCR は Light Cycler Software Version 3.5 (Roche Diagnostics) を使用した。Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase mRNA 発現量と比較し、相対的発現量を算出した。用いたプライマーの塩基配列を表 1. に示す (12)。

表 1. プライマー塩基配列

| | |
|----------------|--|
| <i>Ppp2r2a</i> | (F) 5'-GCAACAGGAGATAAAGGTGGTAG-3' |
| | (R) 5'-TGGTTCATGGCTCTGGAAGGTG-3' |
| <i>Ppp2r2b</i> | (F) 5'-GCGTGATAAGAGGCCAGAAG-3' |
| | (R) 5'-TGTGTGCGTTGGCAAATACT-3' |
| <i>Ppp2r2c</i> | (F) 5'-AGAGCTGATGACCTCACCGTTGTT-3' |
| | (R) 5'-ATCAGATGAGGACACAGGCACACA-3' |
| <i>Ppp2r2d</i> | (F) 5'-CGTGAACAAGAGAATAAAAGCCG-3' |
| | (R) 5'-CTTCAATATTGGGACCCGTAG-3' |
| <i>Ppp2r3a</i> | (F) 5'-ACGCTTGTTGCAGAGGAATC-3' |
| | (R) 5'-TCCAAATTCAGAGGGAGAGG-3' |
| <i>Ppp2r3c</i> | (F) 5'-TCGTCGGCGCCTAGCGACGCCCAACACCTG-3' |
| | (R) 5'-ATCGCTTCCTCTCCAATCATAGGTGGTGTCTGGTGTGTTGTCCAGC-3' |
| <i>Ppp2r4</i> | (F) 5'-GCTGAGGGCGAGCGGCAGCCGCCCA-3' |
| | (R) 5'-GCCAGATGGGTAGGGACCACTGTGGCCACC-3' |
| <i>Ppp2r5a</i> | (F) 5'-GAGTATGTTTCAACTAATCGTGGTGTAATTGTTGAATCAGCG-3' |
| | (R) 5'-TCCATAAATTCGGTGCAGAACAGTCTTCAGG-3' |
| <i>Ppp2r5b</i> | (F) 5'-GACAACTGCCACACTGTGCT-3' |
| | (R) 5'-TCCAGCTTGTAGGAGGCTGT-3' |
| <i>Ppp2r5c</i> | (F) 5'-GTAATAAAGCGGGCAGCAGG-3' |
| | (R) 5'-CAAAGTCAAAGAGGACGCAACA-3' |

Ppp2r5d (F) 5'-AACTCCAAGAGCCACTGGAA-3'
(R) 5'-TGCCACATCTCTTCCCTTTC-3'
Ppp2r5e (F) 5'-AAGCCAGACAGAAGAGGTCGCA-3'
(R) 5'-AGGAACAGTTCAGGCTGCTCTG-3'

8. ウェスタンブロット (WB) 法

E1 細胞を PBS で洗浄した後、プロテアーゼ阻害剤を含むドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶解緩衝溶液 (50 mM Tris-HCl、pH 6.8、2% SDS、10% グリセロール、6% メルカプトエタノール) を用いて超音波破碎により溶解した。溶解液のタンパク濃度を Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories) を用いて分光光度計により決定した。その後、Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories)-2-メルカプトエタノール (Wako Pure Chemical Industries) を添加し、70°C、30 分加熱し変性させ、-30°C で保存した。同濃度のタンパクを含む 30 μ L のサンプルを 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。電気泳動後、タンパクをニトロセルロース膜 (Bio-Rad Laboratories) に転写した。セルロース膜を TBST (25 mM Tris-HCl、pH 8.2、144 mM NaCl、0.1 % Tween 20) で洗浄した後、常温 1 時間、5% スキムミルク/TBST でブロッキングを行い、TBST による洗浄後、特異的二次抗体で常温 1 時間処理した。TBST による洗浄後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合二次抗体と常温 1 時間反応させて、TBST により洗浄した。化学発光試薬として ECL キット (GE Healthcare/Amersham Biosciences) を使用した。検出したバンドの定量は computer-assisted densitometry (MultiImagerII Mi-II600CB; Bio-Tools, maebashi, Japan) を用いて行った。

9. 核の抽出及び NF- κ B RelA 転写活性測定

E1 細胞を PBS/Phosphatase inhibitor solution に溶解し 300 \times g で 5 分間遠心分離した。溶解物を 10% Nonidet P-40 でインキュベートし、4 $^{\circ}$ C で 30 分遠心分離後、ペレットを 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 420 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10 % glycerol, 1 mM dithiothreitol を含む各抽出バッファーで再懸濁後 14,000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離した。上清を NF- κ B RelA アッセイに使用した。活性は Abcam で購入したキットによって行った。

10. 免疫沈降法

E1 細胞を 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM dithiothreitol, 25 μ g/mL *p*-amidinophenylmethylsulfonyl fluoride, 3 μ g/mL aprotinin, 5 μ g/mL leupeptin, and 2.5 μ g/mL pepstatin A を添加した溶解バッファーに回収し 4 $^{\circ}$ C で 1 時間可溶化後、15,000 \times g で 30 分遠心分離し溶解物を精製した。溶解物を 4 $^{\circ}$ C で 2 μ g 抗 RelA ウサギポリクローナル抗体で一晩処理した後、10 mg protein G-Sepharose beads と混合し 4 $^{\circ}$ C で 1 時間反応後、溶解バッファーにて 3 回洗浄した。SDS-PAGE sample buffer で 5 分間煮沸後 WB 法を行った。

11. 組み換えタンパク質の調製

GST 発現用のプラスミドベクターを形質転換させた大腸菌 BL-21 (DE3) 株を 37 $^{\circ}$ C、600 回/分

の振盪器で 12~14 時間培養し、吸光度が 0.4 になったところで、18°C、イソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド 250 µg/mL で培養した。細菌は溶解バッファー (50 mM Tris-HCl at pH 8.0, 300 mM NaCl, 25 g/mL pamidinophenylmethylsulfonyl fluoride, 3 g/mL aprotinin, 5 g/mL leupeptin and 2.5 g/mL pepstatin)、1% Triton X-100 添加後 30 分遠心分離し glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) を用いて溶解物を精製した。発現した GST 遺伝子組み換えタンパク質は、SDS-polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE) 後に Coomassie Brilliant Blue (CBB) で染色し純度を確認した。対象の組み換え分子を一晩透析し使用前に 100,000 rpm で 30 分間遠心分離した。

12. 結合実験

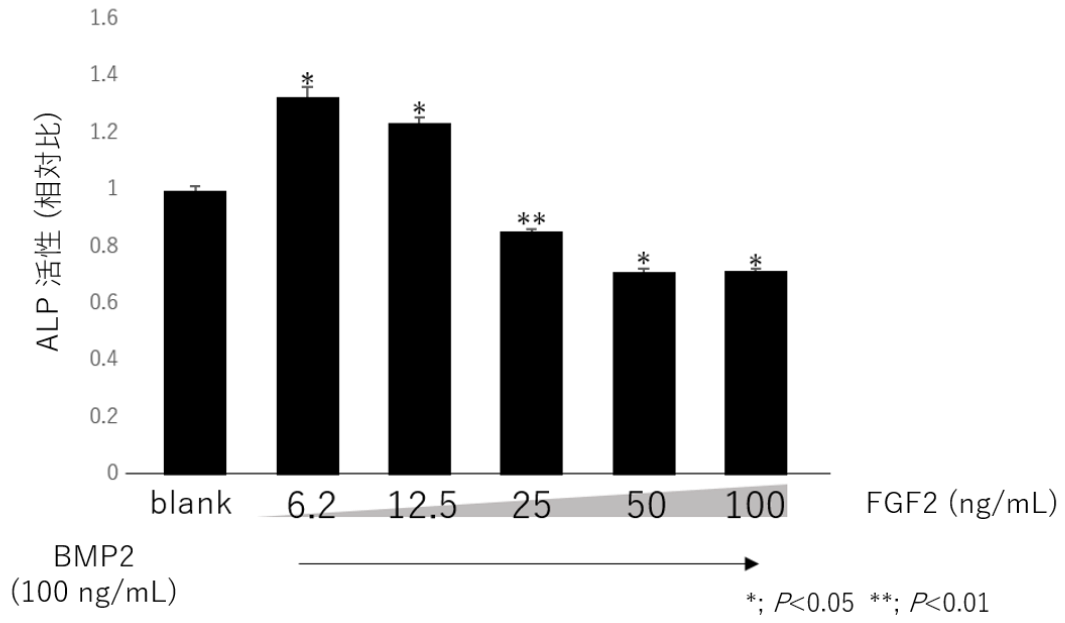
GST タグの標識された GST-transactivation 2 (TA2) の精製タンパク質を反応バッファー (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol) に glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) を添加し 4°C で 30 分間インキュベートした。前述のバッファーで洗浄後ビーズを E1 細胞破碎液と 4°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後にビーズを反応バッファーで 3 回洗浄し、50 µL のサンプルバッファーで 5 分間煮沸し SDS-PAGE を行った後 WB 法を行った。結合した GST-TA2 及び PR55β はそれぞれの抗体を使用して検出した。

結 果

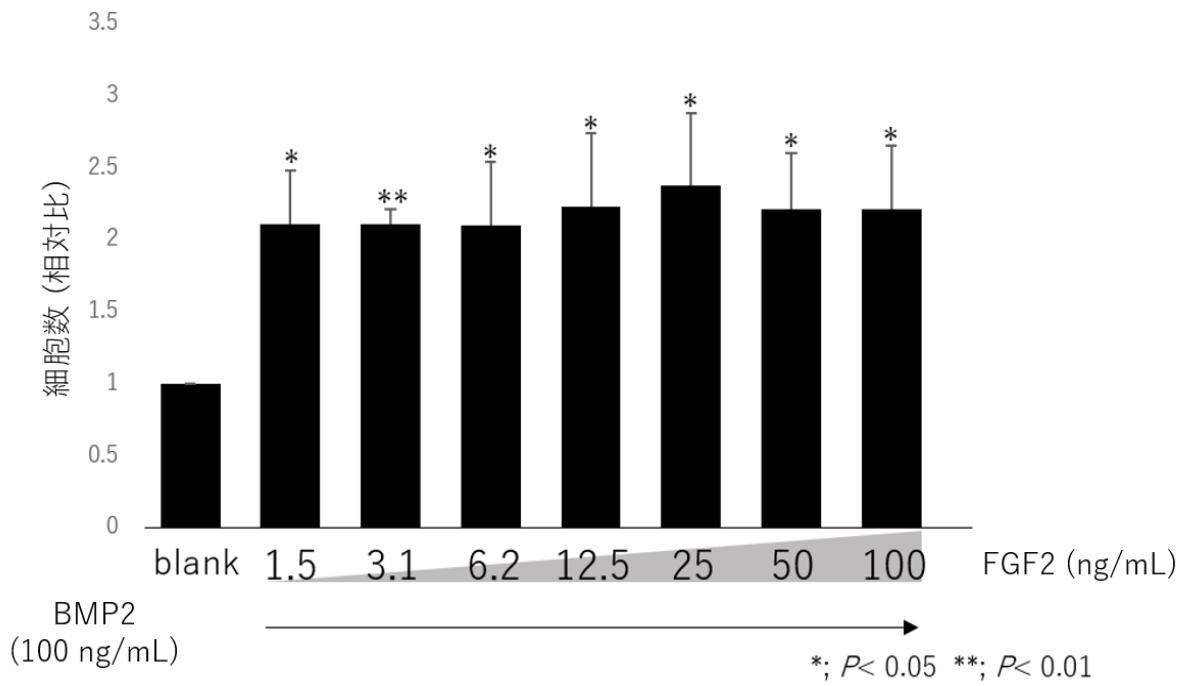
1. E1 細胞の ALP 活性に対する FGF2 の影響

FGF2 が E1 細胞の分化に関与しているか検討するために、BMP2 (100 ng/mL) 存在下に FGF2 (6.2 ng/mL~100 ng/mL) で刺激し ALP 活性を検討した。100, 50, 25 ng/mL と高濃度の FGF2 刺激では ALP 活性は抑制された。一方で、FGF2 濃度が 12.5, 6.2 ng/mL と低濃度になると、ALP 活性は blank 値よりも促進された (図 1A)。次に、これらの ALP 活性の抑制、促進効果が単に細胞数増加によるものであるのかを検討するため、細胞数測定を行った。FGF2 刺激により E1 細胞数は常に増加した。(図 1B)。低濃度の FGF2 刺激は E1 細胞分化に対して抑制的な作用を示さない一方で、細胞増殖に対しては高濃度の FGF2 と同等の作用を示したことから、FGF2 による E1 細胞の分化に対するシグナルと増殖に対するシグナルは、それぞれ独立的な経路を介した作用機序も存在することが示唆された。また、FGF2 刺激後に細胞形態を観測した。高濃度 FGF2 刺激では細胞が密集しているものの形態が星状に変化した (図 1C)。低濃度 FGF2 刺激下では細胞形態が索状となり、骨芽細胞の分化が示唆された。

A



B



C

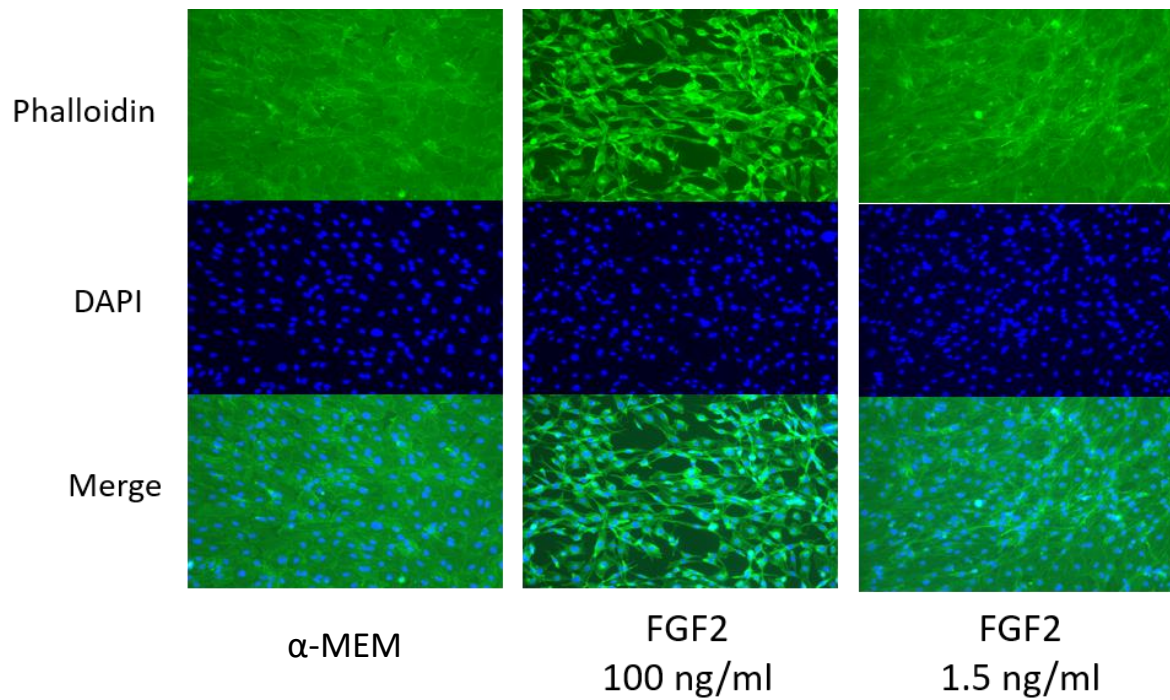


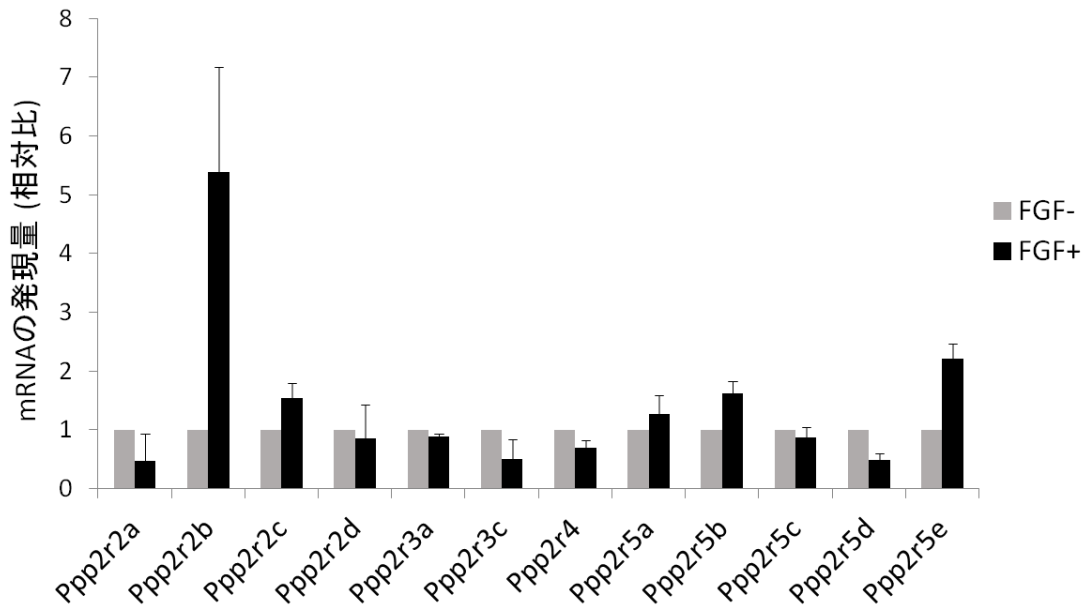
図 1. E1 細胞の ALP 活性に対する FGF2 の影響

E1 細胞に対して、BMP2 (100 ng/mL) 存在下に FGF2 (6.2 ng/mL~100 ng/mL) で刺激し ALP 活性を測定した (A)。A と同様の条件下で 5 日間培養し血球計測盤で、細胞数を測定した (B)。E1 細胞に対して、FGF2 (1.5 ng/mL or 100 ng/mL) 刺激後に細胞形態を観測した (C)。

2. 各 PP2A 調節サブユニットの mRNA 発現量の比較

FGF2 により活性化した FGF シグナルの翻訳産物として発現量が増加するホスファターゼ PP2A の B サブユニットの存在が示唆されたため、この発現様式を調べた。E1 細胞に対して、定量的リアルタイム PCR 法を用いて、各 PP2A の B サブユニットの mRNA 発現量を解析した。すると *Ppp2r2b* の mRNA 発現量が無刺激時と比較して増加した (図 2A)。次に *Ppp2r2b* 遺伝子の翻訳産物である PR55 β の E1 細胞におけるタンパク質発現量を解析した。すると、E1 細胞において PR55 β が発現していることが確認された (図 2B)。この時、ERK がリン酸化されることも明らかになった。また、FGF2 の競合的阻害剤である PD161570 (10 nM) を併用させるとこの発現量は減弱した。

A



B

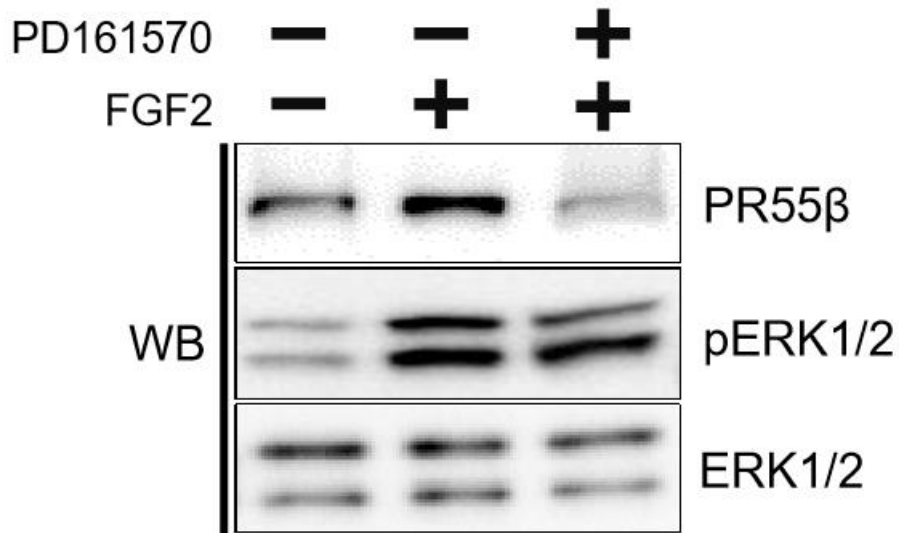


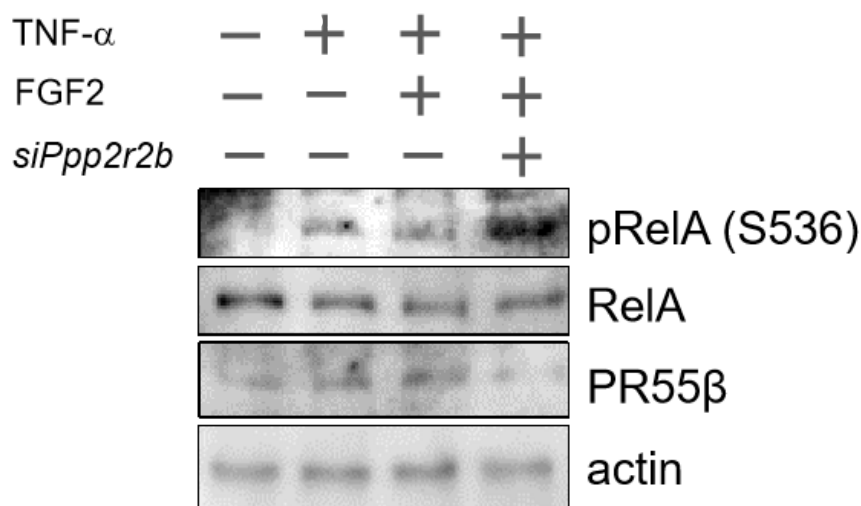
図2. 各 PP2A の B サブユニットの mRNA 発現量の比較

FGF2 (100 ng/mL) で 5 日間培養した後、E1 細胞から cDNA を合成して、各 B サブユニットの発現量を定量的リアルタイム PCR 法により解析した (A)。PR55β および ERK の抗体を用いて WB 法で解析を行った。PD161570 (10 nM) を含むまたは含まない FGF2 を刺激に使用した。Total ERK 1/2 をコントロールとして使用した (B)。

3. E1 細胞における RelA リン酸化に対する FGF2 の影響

E1 細胞において TNF- α 刺激を行うと RelA がリン酸化されることを確認した。TNF- α により活性化された RelA のリン酸化は、FGF2 刺激により抑制された。また *Ppp2r2b* 遺伝子の siRNA とコントロール遺伝子の siRNA を導入し、PR55 β の影響を検討した。*Ppp2r2b* 遺伝子の siRNA を導入した群では FGF2 刺激による RelA のリン酸化の抑制が解除された (図 3A)。さらに FGF2 刺激が RelA を含む NF- κ B の核内移行へ及ぼす影響を免疫細胞化学的に検討した。FGF2 刺激により NF- κ B の核内移行は抑制され、*Ppp2r2b* 遺伝子の siRNA を導入した群では FGF2 刺激による NF- κ B の核内移行抑制が解除された (図 3B)。これらのことから外因性 FGF2 刺激により FGF シグナル伝達の活性化が RelA の脱リン酸化と PR55 β の発現を介して NF- κ B シグナル伝達を抑制していることが示唆された。

A



B

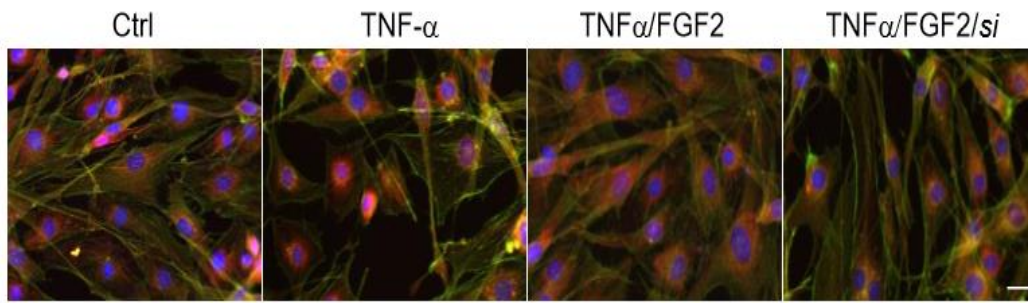


図 3. FGF2 が RelA の脱リン酸化状態に及ぼす影響

抗リン酸化 RelA 抗体、抗 PR55 β 抗体 を用いて WB 法で解析を行った。 β -actin をコントロールとして用いた (A)。E1 細胞に対して TNF- α および FGF2、*siPpp2r2b* を加えた。また、ネガティブコントロールとしてスクランブル siRNA を導入した。抗 RelA 抗体を用いて細胞免疫染色を行った。スケールバー、10 μ m (B)。実験は独立して 3 回行い同じ傾向の結果が得られ、代表例を示した。

4. NF-κB 活性に対する PR55β の影響

購入したキットを用いて TNF-α 刺激下における NF-κB 活性を検討した。NF-κB 活性は TNF-α 刺激により活性化されたが、FGF2 刺激により抑制された。さらに *Ppp2r2b* 遺伝子の siRNA とコントロール遺伝子の siRNA を導入し PR55β の影響を検討した。*Ppp2r2b* 遺伝子の siRNA を導入した群では FGF2 刺激による NF-κB 活性の抑制が解除された (図 4)。このことから PR55β が NF-κB 活性にも関与しており直接相互作用することが示唆された。

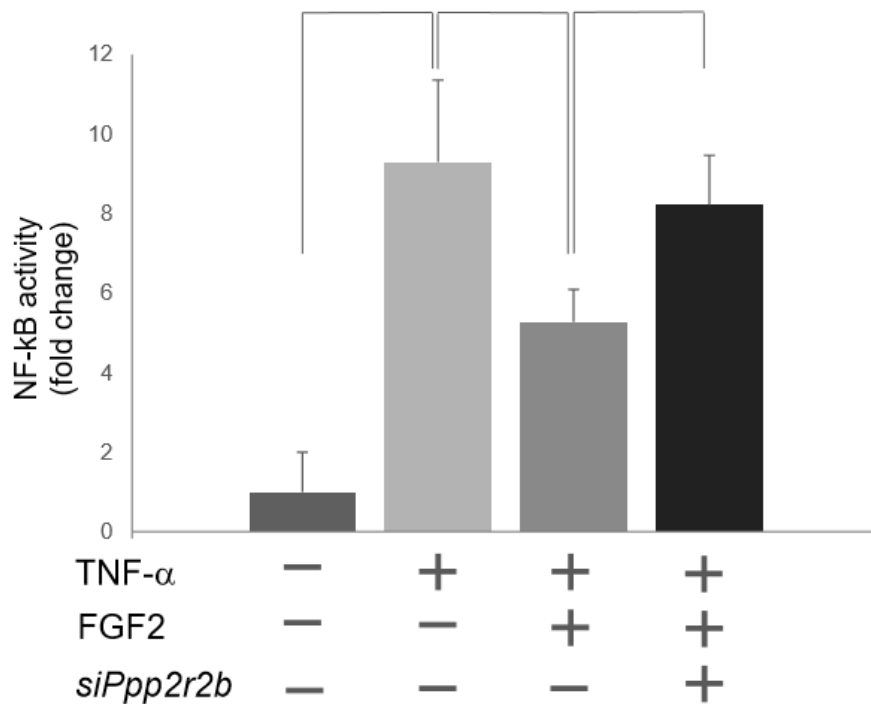


図 4. PR55β の NF-κB シグナル伝達への影響

NF-κB シグナル伝達活性は、キットを使用して測定した。*Ppp2r2b* 遺伝子の siRNA を導入した群では FGF2 刺激による NF-κB 活性の抑制が解除された。

5. RelA と PR55 β の結合

RelA と PR55 β の細胞内結合を確認するために E1 細胞の細胞破碎液を調整し RelA と PR55 β の抗体を用いて免疫沈降法を行った。結合分子の検出は WB 法を用いて行った。RelA は、コントロールと比較して PR55 β と少量であるが共免疫沈降した (図 5)。

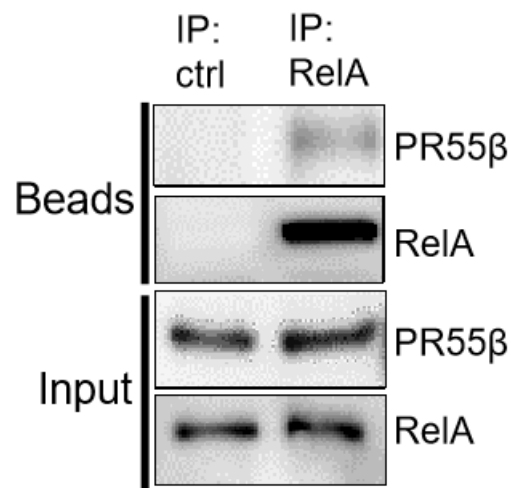


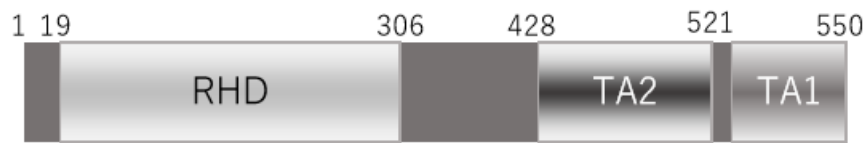
図 5. FGF2 の PR55 β と RelA の結合に対する影響

プロテイン G-セファロースビーズにより固定化された抗 RelA 抗体を使用して、免疫沈降を行った。コントロール群はネガティブコントロール抗体を用いた。細胞破碎液の 10% 容液をインプットサンプルとした。

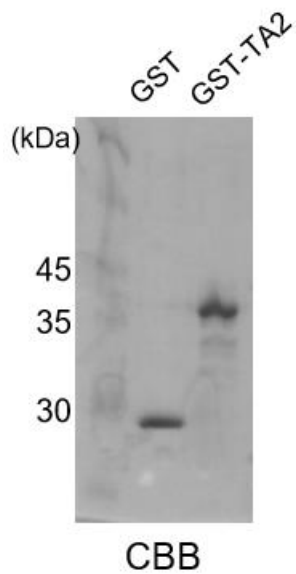
6. PR55 β を介した RelA の TA2 ドメインと PP2A 間の直接相互作用

最後に、PR55 β が RelA に結合する部位について検討した。RelA のタンパク質ドメイン構造を図に示す (図 6A)。RelA は 550 個のアミノ酸配列からなり、その N 末端側にデオキシリボ核酸結合領域を有する Rel homology domain (RHD) があり、C 末端側には 2 つの異なる転写活性ドメイン TA1 と TA2 が存在する。このうち PR55 β と RelA の相互作用が TA2 ドメインを介した直接結合によって行われる可能性を考え、両者のリコンビナントタンパク質を用いた結合実験を行った。まず精製した GST、GST-TA2 タンパク質を 1 μ L ずつ電気泳動し CBC 染色を行った (図 6B)。GST は 30 kDa、GST-TA2 は 36 kDa に単一のバンドが同程度の濃さで染色されたことを確認した。WB 法により結合状態を評価した。GST-TA2 はビーズと固相化され沈降した。このとき、GST 単体で固相化されたものに対して、GST-TA2 と固相化されたレーンでは、PR55 β が共沈した (図 6C)。このことから PR55 β は RelA の TA2 ドメインと結合することが明らかになった。

A



B



C

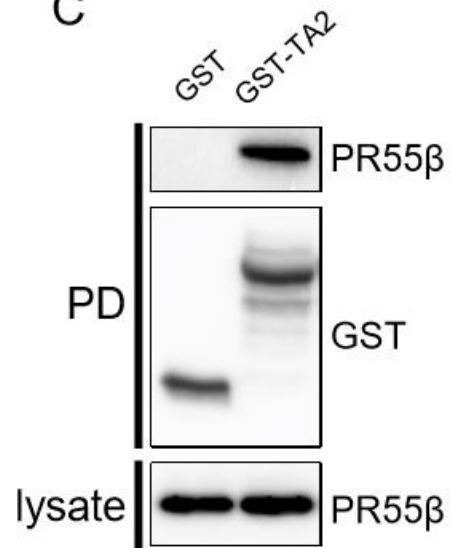


図 6. PR55 β を介した RelA の TA2 ドメインと PP2A 間の直接相互作用

RelA のドメイン構造。RHD は Rel 相同性ドメインであり、TA1 および TA2 ドメインは転写活性ドメインである (A)。組換えタンパク質 GST-TA2 または GST のみを精製し、それらのサイズと濃度を CBB 染色で確認した (B)。PR55 β と GST-TA2 の結合を GST 結合実験で調べた (C)。

考 察

骨代謝を制御する分子メカニズムは多岐にわたり、様々な介在分子が複雑に影響を及ぼしながら、その細胞の機能を構築していく。骨芽細胞は、骨形成の中心的役割を担うことから、その細胞分化や増殖を調節する機構を解明することは、骨組織の恒常性の観点から重要である。顎骨炎に代表される骨の炎症性疾患は、一旦発症すると、その炎症を制御することが非常に困難であり、治療に難渋する。また病状の進行により、腐骨が形成される。腐骨周囲には炎症性肉芽の介在があり、腐骨を適切に除去することで、上皮化や骨新生が進むことから、周囲に存在する骨芽細胞は、隣接する組織から FGF などの様々な増殖因子の支持をうけ、炎症を制御する機構がはたらいていると思われる。特に FGF は骨芽細胞においても極めて重要なサイトカインである。FGF2 のノックアウトマウスは骨形成不全を呈する。また FGF2 に相応する受容体である FGFR1 は骨芽細胞の細胞膜表面に発現しており、このノックアウトマウスも骨形成不全を呈する。このことから、骨形成における FGF2 の重要性が示唆される。また、骨芽細胞の分化や増殖を調節する FGF シグナルの制御機構を解明し、炎症性シグナルとの関連性を明らかにする分子生物学的研究は、骨の炎症性疾患に対する新たな知見を得る重要な意義をもつ。

まず、E1 細胞において、FGF2 刺激による細胞分化や増殖に対する影響を検討した。これまで同様の研究は散見されるものの一定の見解が得られていなかった。この結果、FGF2 刺激により E1 細胞において ALP 活性が抑制されることが明らかになり、FGF2 誘導性のシグナル経路は骨芽細胞分化に対して抑制的に作用することが示唆された。興味深いことに、この抑制作用は FGF2

の濃度希釈が進むにつれて逆に ALP 活性を促進した。このとき FGF2 の細胞増殖に対する促進作用は保たれていた。つまり、FGF2 の相反作用が生じるメカニズムとして、FGF2 による細胞増殖作用によるものが考えられた。この結果は、細胞分化と増殖に対してそれぞれ独立的な経路を介した作用機序が存在することを示唆している。FGF2 は骨芽細胞の増殖に必須であるが、効果的な細胞分化を誘導するためには、その作用を阻害しない適切な濃度に調節されている必要があると考えられた。骨の形成不全や形態異常に対する分子生物学的解析により、原因と考えられる様々な分子が明らかになってきている (13)。FGF シグナルの恒常的活性化が認められる Apert 症候群の病態では、頭蓋顔面骨縫合の早期癒合が認められる (14)。本研究結果から、その発症メカニズムを支持する知見が得られた。この外因性 FGF2 の分泌が何によって誘導されるのかは依然として不明である。近年、内分泌因子として注目される FGF23 は血中リン濃度に反応して、骨細胞や骨芽細胞からの分泌を調節することが明らかになった。FGF2 も骨における同様の作用機序などが考えられたが、今後更なる検討が必要である。

次に、本研究では骨芽細胞における FGF シグナルと PP2A の関連性に着目した。PP2A の機能を規定するのは B サブユニットである。骨芽細胞において FGF2 誘導性の FGF シグナルを制御する B サブユニットが存在すると考え、定量的リアルタイム PCR 法を用いてその発現様式を検討した。このうち FGF2 刺激により明らかに発現量が増加したのは *Ppp2r2b* 遺伝子だけであり、この遺伝子からの翻訳産物である PR55 β タンパク質の関与が示唆された。PR55 β はタンパク質発現量も FGF2 刺激により増加することが WB 法で確認された。しかしながら、siRNA を用いた

PR55 β の発現抑制実験では ALP 活性に有意な差が認められなかった。PR55 β は、胎生期に発現が認められ、成長とともにその発現量が減少していくタンパク質である (15)。主に、脳や精巣などに発現が認められ、肺や脾臓などでもわずかに認められる。そのため、胎生期の正常な細胞分化に関連する分子と考えられている。さらに、がん細胞においても発現量が高いことが明らかになっている (12,16)。これらの臓器に加えて今回、骨芽細胞に PR55 β が発現することが示唆された。FGF2 誘導性の FGF シグナルの活性化に反応して発現量が増加することから、PR55 β が触媒サブユニットとの相互作用により、何らかの脱リン酸化制御に関わっていることが予想された。骨芽細胞の分化に対する影響を考えたが、本実験においてそれを確認することはできなかった。細胞分化と増殖のシグナル経路が独立していることを考慮すると、PR55 β が細胞増殖へ作用する機序も考えられた。しかしながら、PR55 β の発現量は高濃度 FGF2 でのみ増加しており、低濃度 FGF2 では有意な差は認められなかった (データ未発表)。一方、骨芽細胞の増殖能は低濃度 FGF2 刺激においても保たれていた。このことから、細胞増殖シグナルへの作用も考えにくく、他のシグナル経路において標的分子が存在する可能性が推察された。以上のことから、FGF2 によって導かれる PR55 β が標的とする他のシグナル経路の存在が考えられた。

FGF シグナルは細胞増殖や分化へ及ぼす影響の他にも、創傷治癒促進や炎症による組織損傷から再生する役割も担っている (17)。歯周病による歯槽骨の炎症性骨吸収に対して、FGF2 製剤が作用することで骨新生がもたらされる (18)。このとき、効率的なシグナル伝達を可能にするためには、炎症性シグナルが抑制されている必要がある。すなわち、FGF シグナルの活性化が NF- κ B

シグナルを抑制する機序が存在する。この二つのシグナル経路における関連性は、これまでも報告されている (19)。しかしながら、このクロストークを可能にする介在分子の存在については明らかにされていなかった。一方、NF- κ B シグナルが活性化すると p50 と RelA の NF- κ B 複合体が核内移行する。このとき、RelA 自身もリン酸化制御をうけており、ホスファターゼによる脱リン酸化は RelA の局在と NF- κ B シグナルの活性化に影響を及ぼす (20)。さらに RelA の脱リン酸化制御機構として PP2A の関与も報告されている (21)。しかしこれまで B サブユニットの存在まで詳細に解析した研究はなく、その作用機序は明らかになっていなかった。本研究では、この FGF シグナルの活性化と PR55 β を介した PP2A による NF- κ B の脱リン酸化制御の関連性について検討した。

E1 細胞における FGF シグナルの活性化は TNF- α によって誘導される RelA のリン酸化状態を減弱させた。また、RelA の局在も核内から核外へ移行した。*siPpp2r2b* 遺伝子導入によりこの阻害作用が回避されることから、PR55 β がこの脱リン酸化制御に関わっている可能性が示唆された。

さらに、NF- κ B の転写活性を測定した実験も同様の結果であり、NF- κ B シグナルのリン酸化制御機構において PR55 β は NF- κ B の転写活性を調節する重要な役割を担うことが確認された。しかしながら NF- κ B が PR55 β の標的分子かどうかは不明であったため、NF- κ B と PR55 β の相互作用について更なる詳細な解析を行った。細胞内の免疫複合体やリコンビナントタンパク質を用いた結合実験は、PR55 β が TA2 ドメインを介して NF- κ B と直接結合していることを明示した。

RelA は標的遺伝子のプロモーター領域やエンハンサー領域に結合することで転写活性を調節する RHD の他に、二つの TA ドメインから構成される。このうち、TA2 ドメイン内には複数のリン酸

化部位が配列されており、PR55 β と結合している可能性が考えられた。リコンビナントタンパク質を用いた実験は培地環境や他の修飾因子の影響を排除し、直接的な分子間相互作用の解析を可能にする。本研究で示された、PR55 β と RelA の直接的な結合により、PP2A 触媒サブユニットが RelA のアミノ酸 536 番目セリン (Ser536) を脱リン酸化する可能性が示唆された。Ser536 は TA1 領域に存在し、複数ある RelA リン酸化部位の中でも、NF- κ B の活性化に最も重要な部位と考えられている。ただ PR55 β が TA2 ドメインのどの部位と結合するのか更なる検討が必要である。また、Ser536 を脱リン酸化する構造的変化が必要と考えられるため、分子構造のシュミレーションモデルを構築し、結合状態について詳細な検討を行うことで、この相互作用を可能にする動的メカニズムの解明につながるだろう。

本研究では、骨芽細胞の FGF シグナルの活性化が炎症性シグナルである NF- κ B シグナルを抑制する分子メカニズムの一端を明らかにした。PP2A の調節サブユニットが介在することで、シグナル間の相互作用を効率的かつ正確に抑制することができる。以上のことから、骨芽細胞内の時空的制御を可能にする PP2A の効率的な脱リン酸化制御機構の重要性が明らかになった。

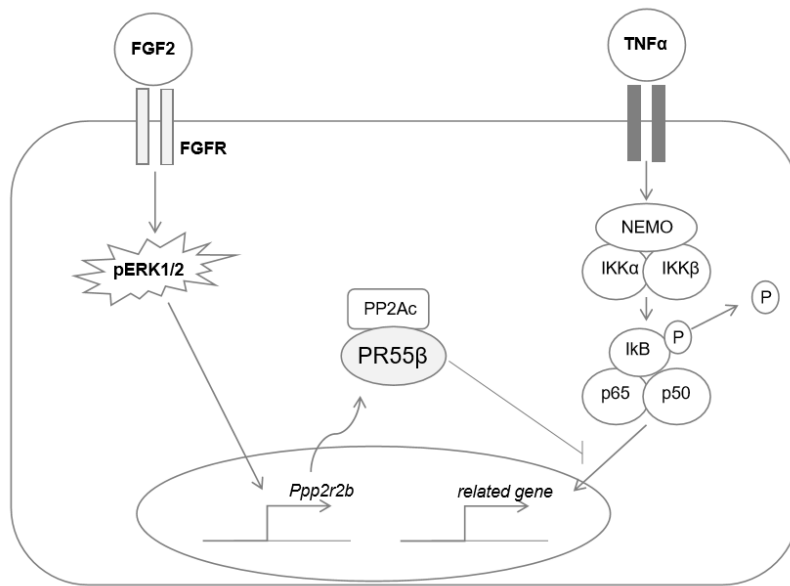


図 7. 骨芽細胞における PR55β を介した NF-κB のリン酸化制御機構

謝 辞

稿を終えるにあたり、御校閲を頂きました 森 悦秀 教授に謝意を表します。また、本研究の課題を与え、実験方法や研究に対する姿勢など、直接指導頂きました 杉山 悟郎 博士に深謝致します。

そして、様々な御助言や励ましのお言葉を頂いた、九州大学大学院 歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野の教官各位、研究室の皆様、研究生生活を支えてくださった全ての皆様方に、心から深く感謝致します。

参 考 文 献

1. Corrado, A., Sanpaolo, E. R., Di Bello, S., and Cantatore, F. P. (2017) Osteoblast as a target of anti-osteoporotic treatment. *Postgraduate Medicine* **129**, 858-865
2. Osathanon, T., Nowwarote, N., and Pavasant, P. (2011) Basic fibroblast growth factor inhibits mineralization but induces neuronal differentiation by human dental pulp stem cells through a FGFR and PLCgamma signaling pathway. *Journal of Cellular Biochemistry* **112**, 1807-1816
3. Itoh, N., and Ornitz, D. M. (2008) Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **237**, 18-27
4. Ornitz, D. M., and Itoh, N. (2015) The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental Biology* **4**, 215-266
5. Sobue, T., Gravely, T., Hand, A., Min, Y. K., Pilbeam, C., Raisz, L. G., Zhang, X., Larocca, D., Florkiewicz, R., and Hurley, M. M. (2002) Regulation of fibroblast growth factor 2 and fibroblast growth factor receptors by transforming growth factor beta in human osteoblastic MG-63 cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **17**, 502-512
6. Okamura, H., Yoshida, K., Ochiai, K., and Haneji, T. (2011) Reduction of protein phosphatase 2A Calpha enhances bone formation and osteoblast differentiation through the expression of bone-specific transcription factor Osterix. *Bone* **49**, 368-375
7. Cohen, P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* **58**, 453-508
8. Magnusdottir, A., Stenmark, P., Flodin, S., Nyman, T., Kotenyova, T., Graslund, S., Ogg, D., and Nordlund, P. (2009) The structure of the PP2A regulatory subunit B56 gamma: the remaining piece of the PP2A jigsaw puzzle. *Proteins* **74**, 212-221
9. Reiff, D. A., Kelpke, S., Rue, L., 3rd, and Thompson, J. A. (2001) Acidic fibroblast growth factor attenuates the cytotoxic effects of peroxynitrite in primary human osteoblast precursors. *The Journal of Trauma* **50**, 433-438; discussion 439
10. Zhang, H. N., Li, L., Gao, P., Chen, H. Z., Zhang, R., Wei, Y. S., Liu, D. P., and Liang, C. C. (2010) Involvement of the p65/RelA subunit of NF-kappaB in TNF-alpha-induced SIRT1 expression in vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **397**, 569-575
11. Zhang, B., Yan, J., Umbach, A. T., Fakhri, H., Fajol, A., Schmidt, S., Salker, M. S., Chen, H., Alexander, D., Spichtig, D., Daryadel, A., Wagner, C. A., Foller, M., and Lang, F. (2016) NFkappaB-sensitive Orail expression in the regulation of FGF23 release. *Journal of*

Molecular Medicine **94**, 557-566

12. Ishibashi, K., Ishii, K., Sugiyama, G., Kamata, YU., Suzuki, A., Kumamaru, W., Ohyama, Y., Nakano, H., Kiyoshima, T., Sumida, T., Yamada, T., and Mori Y. (2018) Regulation of β -Catenin Phosphorylation by PR55 δ in Adenoid Cystic Carcinoma. *Cancer Genomics proteomics***15**, 53-60
13. Muenke, M., Kress, W., Collmann, H., and Solomon, B. (2011) *Craniosynostoses : molecular genetics, principles of diagnosis and treatment*, Karger, Basel **19**, 119-142
14. Yukiho, T., Masahiko, Y., Kenji, H., Kazuya, M., Hideki, N., Toshio, M., PierreJ, M., and Keiji M. (2004) A Soluble Form of Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2) with S252W Mutation Acts as an Efficient Inhibitor for the Enhanced Osteoblastic Differentiation Caused by FGFR2 Activation in Apert Syndrome. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 45926-45934
15. Smits, P. H., Smits, H. L., Minnaar, R. P., Hemmings, B. A., Mayer-Jaekel, R. E., Schuurman, R., van der Noordaa, J., and ter Schegget, J. (1992) The 55 kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A plays a role in the activation of the HPV16 long control region in human cells with a deletion in the short arm of chromosome 11. *The EMBO Journal* **11**, 4601-4606
16. Jing, T., Puay, L., Zhimei, L., Yaw, C., Shing, C., and Qiang, Y. (2010) B55 δ -Associated PP2A Complex Controls PDK1-Directed Myc Signaling and Modulates Rapamycin Sensitivity in Colorectal Cancer. *Cancer Cell***18**, 459-471
17. Grose, R., and Werner, S. (2004) Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. *Molecular Biotechnology* **28**, 147-166
18. Meraw, S. J., Reeve, C. M., Lohse, C. M., and Sioussat, T. M. (2000) Treatment of peri-implant defects with combination growth factor cement. *Journal of Periodontology* **71**, 8-13
19. Beck, C. W., Sutherland, D. J., and Woodland, H. R. (1998) Involvement of NF-kappaB associated proteins in FGF-mediated mesoderm induction. *The International Journal of Developmental Biology* **42**, 67-77
20. Valdes, J. A., Hidalgo, J., Galaz, J. L., Puentes, N., Silva, M., Jaimovich, E., and Carrasco, M. A. (2007) NF-kappaB activation by depolarization of skeletal muscle cells depends on ryanodine and IP3 receptor-mediated calcium signals. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **292**, C1960-1970
21. Yang, J., Fan, G. H., Wadzinski, B. E., Sakurai, H., and Richmond, A. (2001) Protein phosphatase 2A interacts with and directly dephosphorylates RelA. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 47828-47833